Aus dem Hygienischen Institut der Universität Breslau
(Direktor: Professor Dr. Carl Prausnitz).

Vergleichende Untersuchungen

über den Gehalt an
Staphylococcen-Antitoxin und bakteriziden Antikörpern
gegenüber Staphylococcen im Menschen- und Tierblut.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Würde eines Doktors der Zahnmedizin
bei der Hohen Medizinischen Fakultät
der Schlesischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Breslau

vorgelegt

von

Lothar Frenzel,
Zahnarzt,
in **Peiskretscham OS.**

1934

Druck von Hugo Hiltmann, Liebau i. Riesengeb.

Gedruckt mit Genehmigung
der medizinischen Fakultät der Universität Breslau.

I. Referent: Privatdozent Dr. med. Gertrud Meissner.
II. „ Professor Dr. Henke.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Die Abwehrkräfte des Organismus gegen eine bakterielle Schädigung setzen sich aus den „humoralen", in Blut und Lymphe vorhandenen, und den an die Tätigkeit der lebenden Zelle gebundenen „zellulären" Abwehrstoffen zusammen.

Während Metschnikoff in seiner Phagozytosetheorie die Ansicht vertritt, daß nur die Zellen die Fähigkeit besitzen, die Bakterien durch Phagozytose unschädlich zu machen, kommt Buchner auf Grund seiner eingehenden Studien über die Alexinwirkung zu der gegenteiligen Ansicht, nämlich, daß das zellfreie Blutserum und Blutplasma dieselben keimtötenden Eigenschaften aufweist wie das Gesamtblut. Diese zuerst schwer verständlichen Widersprüche fanden bei weiter fortschreitender Forschung allmählich ihre Klärung. Man kann je nach der Bakterienart, die man prüft, eine verschiedene Lokalisation der bakteriziden Stoffe feststellen. Aus den Arbeiten von Nutall, Gruber und seinen Schülern, Pettersen u. a. m. weiß man, daß gegen Milzbrand und milzbrandähnliche Keime im Normal-Serum thermostabile, bakterizide Stoffe, die sogen. Anthrakozidine, vorhanden sind. Für gr. neg. Bakterien, wie Choleravibrionen und Typhusbazillen findet man ebenfalls im Normal-Serum bakterizide, aber thermolabile Stoffe, die sogen. Alexine Buchners, deren Eigenschaften im Zusammenhang mit spezifischen Immunantikörpern zu der Bordet-Ehrlich'schen Auffassung der Komplexwirkung der Immunbakteriolyse geführt haben. Die bakteriziden Stoffe im Normalblut gegen gr. pos. Coccen wie Pneumococcen, Streptococcen und Staphylococcen haben ihren Sitz vor allen Dingen in den Leukozyten. Der Gehalt an Antikörpern im Blut der verschiedenen Tierarten ist jedoch durchaus nicht gleichmäßig, wie Mackie und Finkelstein auf Grund ihrer an einem großen Material durchgeführten Untersuchungen feststellen konnten. Sie untersuchten das Serum von Meerschweinchen, Kaninchen, Menschen, Ratten, Pferden, Schweinen, Rindern, Hammeln und Tauben in seiner bakteriziden Wirkung gegenüber mehreren Stämmen der wichtigsten Vertreter der gr. pos. und gr. neg. Bakterien und kamen zu dem Ergebnis, daß große Unterschiede zwischen den Seren verschiedener Tierspezies gegenüber einer Bakterienart auftreten können, ja, daß sogar die verschiedenen Stämme einer Bakterienspezies nicht gleichmäßig von einem Serum beeinflußt werden.

So fanden sie für einen Streptococcus haemolyticus im Kaninchen-, Ratten- und Pferdeserum starke Bakterizidie, im Menschen-, Hammel- und Rinderserum gelegentlich einen geringeren Grad, während Schweine-, Meerschweinchen- und Taubenserum unwirksam war. Für einen Staphylococcus aureus stellten sie bakterizide Wirkung fest im Kaninchen- und Rattenserum, und eine Spur im Menschenserum, während Pferde-, Schweine-, Hammel-, Rinder-, Meerschweinchen- und Taubenserum keine Bakterizidine für den gleichen Stamm besaßen. Besonders eingehend ist die Frage der Blutbakterizidie bei Staphylococcen studiert worden. Zeißler, Much, Mackie und Finkelstein finden im Menschenserum gegenüber Staphylococcen nur schwache oder gar keine bakteriziden Stoffe, während menschliche Leukozyten stark bakterizid wirken. Meerschweinchenserum enthält ebenfalls keine Bakterizidine für Staphylococcen. Im Kaninchenserum konnten Mackie und Finkelstein schwache bakterizide Kräfte für Staphylococcen nachweisen. Wolff fand im Serum normaler wie immuner Kaninchen keine bakterizide Wirkung.

Außer den bakteriziden Antikörpern enthält das Menschenblut, insbesondere das Menschenserum noch Antitoxine für Staphylococcen. Der Nachweis von Staphylococcen-Antitoxinen im normalen Menschenserum ist erstmalig von Neisser geführt worden, seine Untersuchungen sind dann von vielen anderen weiter ausgebaut worden. In neuester Zeit haben Bryce und Burnet (1932) die Versuche wieder aufgenommen und eine Reihe von Normalsera von Menschen verschiedener Altersstufen geprüft; dabei konnten sie ähnlich wie bei der Diphteriedurchseuchung eine Kurve aufstellen, die das Ansteigen des Antitoxingehaltes im Menschenserum mit zunehmendem Alter zeigt. Während im ersten Lebensjahre der Antitoxingehalt nur bei 30% der Kinder höhere Werte annimmt, steigt der Prozentsatz der Sera mit hohem Antitoxingehalt bei Kindern von 4 Jahren auf 50% und erreicht zwischen dem sechsten und siebenten Lebensjahre mit 80% seinen Höhepunkt.

Da wir aus den Untersuchnngen von Wright und seinen Schülern, desgleichen von vielen anderen wissen, daß auch im Bakterizidiegehalt des Blutes normaler Menschen Unterschiede vorhanden sind, ergab sich die Frage, ob und welche Beziehungen zwischen antitoxischen Antikörpern im Serum und bakteriziden Antikörpern im Blut bestehen.

Ich habe auf Veranlassung von Fräulein Privatdozent Dr. Meißner diese Frage näher geprüft. Die Arbeit zerfällt in 3 Teile. Im ersten Abschnitt wurden die Blute normaler

und kranker Menschen auf ihre bakterizide Wirkung für Staphylococcen geprüft, Abschnitt 2 enthält die Prüfung der gleichen Seren auf ihren Antitoxingehalt. Zum Vergleich wurden die Blute normaler Kaninchen und Meerschweinchen ebenfalls mit beiden Untersuchungsmethoden geprüft. Abschnitt 3 gibt eine Gegenüberstellung der in beiden Versuchsreihen gewonnenen Ergebnisse; ferner wird hier versucht, in Absättigungsversuchen die Beziehungen der Staphylococcen-Antitoxine und Bakterizidine zueinander näher zu beleuchten.

Abschnitt I.

Prüfung der Bakterizidie des Blutes für Staphylococcen.

Bei den älteren Arbeiten über dieses Gebiet bestand die Versuchsanordnung im allgemeinen darin, daß ein Gemisch von Blut und Bakterien bei 37° in Kontakt gehalten wurde. Hiervon wurden nach verschieden langen Zeiten gleiche Mengen auf feste Nährböden übertragen; aus dem Vergleich mit gleichzeitig angesetzten Kontrollen wurde der bakterizide Wert des Blutes berechnet. Da diesen Methoden verschiedene Fehlerquellen anhaften, halten die mit ihnen gewonnenen Ergebnisse einer Kritik nicht sicher stand. So läßt sich bei ihnen nach Wolff und anderen nicht entscheiden, ob die Keimverminderung auf echter Bakterizidie beruht oder vielleicht nur auf eine Agglutination der Bakterien zurückzuführen ist. Wolff weist ferner darauf hin, daß der Kontakt mit Luft bei 37° die bakterizide Wirkung von Blut erheblich erhöhen kann. Außerdem wurden häufig Blut und Bakterien nicht lange genug im Kontakt gelassen, sodaß Keime, die in ihrer Lebensfähigkeit zwar abgeschwächt waren, bei Übertragung in einen anderen Nährboden doch noch zu Kolonien auswachsen konnten. Diese Fehlerquellen werden durch die Methoden von Sir A. Wright ausgeschaltet, der die Bakterizidie des Blutes unter den Gesichtspunkten der Tätigkeit der Leukozyten mit eigenen Versuchsanordnungen prüfte. Er bringt defibriniertes Blut und Bakterien in kapillare Hohlräume, gebildet aus 2 Objektträgern, die durch vaselinierte Papierstreifen voneinander getrennt sind; darin wird das Blut-Bakteriengemisch bebrütet, und nach 24 Stunden kann die Zahl der gewachsenen Bakterienkolonien bequem ausgezählt werden. Er schaltet dadurch die Spontanagglutination der Bakterien weitgehend aus, sorgt für Luftabschluß, und Blut und Bakterien bleiben dabei in dauerndem Kontakt.

Wright konnte durch Versuche mit Menschen-, Kaninchen- und Meerschweinchenblut feststellen, daß schon bei gesunden Individuen Unterschiede in der Blutbakterizidie für Staphylococcen bestehen. Er studierte dann die Änderungen der Blutbakterizidie gegenüber Staphylococcen und Streptococcen bei akuten und chronischen Infektionskrank eiten und es gelang ihm und seinen Schülern durch Vaccinbehandlung in vivo und in vitro, ferner durch eine Reihe äußerer Reize, z. B. Bestrahlung mit verschiedenen Lichtarten, die Blutbakterizidie für Staphylococcen zu steigern.

Auf diese Arbeiten bauen sich viele andere auf. Steigerung der Blutbakterizidie tritt bei gesunden Menschen durch unspezifische Reizbehandlung mit Yatren und Aolan auf (Prausnitz und Meißner). Das gleiche beschreibt Pfalz bei gynäkologischen Erkrankungen nach Injektion von Novoprotin, Yatren, Sufrogel, Gonoyatren und nach Autovaccinbehandlung und Scholz, wenn er Magnesiumsalze injizierte. Schwankungen des bakteriziden Index stellt Geller im Zusammenhang mit dem mensuellen Zyklus und mit der Gravidität bei gesunden Frauen fest, während der bakterizide Index bei Männern viel konstanter ist. Allerdings wissen wir aus eigener Erfahrung, daß sich körperliche Indispositionen, wie beispielsweise Erkältung, Ermüdung, Nachwirkungen von Alkoholgenuß u. s. w. in einem Absinken des bakteriziden Index bemerkbar machen. Den Einfluß der Ernährung auf den Bakterizidiegehalt konnte Pfannenstiel an Kaninchen nachweisen.

Versuchsanordnung:

Wir benutzten für unsere Bakterizidieversuche die von Wright angegebene Technik. Sie gestaltet sich folgendermaßen:

Die Blutentnahme beim Menschen wurde durch Venenpunktion am Arm ausgeführt und zwar mit einer Spritze, die durch dreimaliges Aufziehen und Ausspritzen mit Paraff. liquid. von 130° bis 150° sterilisiert worden war. Kaninchen- und Meerschweinchenblute wurden mit ebenso sterilisierter Spritze durch Herzpunktion gewonnen. Das so gewonnene Blut wurde in sterilen Röhrchen mit sterilem, abgebogenem Glasstabe durch langsames, vorsichtiges Drehen des Glasstabes defibriniert. Durch Zusatz von Natriumcitrat die Gerinnung des Blutes zu verhindern, wurde wegen der Schädigung der Leukozyten aufgegeben. (Wolff).

Die Herstellung der Objektträgerkammern ging folgendermaßen vor sich: Auf planer Glasscheibe wurden die Konkav- und Konvexseiten zweier Objektträger festgestellt, und die

Konvexseite des einen auf die Konkavseite des zweiten gelegt. Diese Innenseiten wurden matt geschmirgelt, in der Flamme sterilisiert, und dann wurden aus den beiden Objektträgern durch Zwischenlage von drei in heißer Vaseline getränkten Papierstreifen von 0,08 mm Stärke 2 gleiche Kammern gebildet, die leicht gepreßt wurden. Für die Versuche wurde eine 24stündige Bouillonkultur von Staphylococcus aureus haemolyticus Wright benützt, die entsprechend verdünnt wurde. Dazu wurde die Bouillonkultur, nachdem sie gut durchgeschüttelt worden war, mittels Gummihütchen in eine Glaskapillare bis zu einem beliebigen Eichstrich hochgesogen und sofort wieder zurückgeblasen. Die zurückbleibende Wandhaftung wurde mit 5 Teilen physiologischer NaCl-Lösung verdünnt, und von dieser Hafte 1 : 5 (nach Wright: „Whash über 5“) wurden weitere fallende Verdünnungen hergestellt. Je 10 cmm der Hafte 1 : 240, 1 : 480 und 1 : 960 wurden mit paraffinierter, geeichter Glaskapillare auf paraffinierte Objektträger aufgetragen, (zum Paraffinieren wurde hartes Paraffin mit einem Schmelzpunkt von 58°—60° verwandt) und mit 100 cmm defibriniertem Blut durch mehrmaliges Hochziehen und wieder Ausblasen in sterilen Kapillaren gut durchgemischt. Das Blutcoccengemisch wurde dann langsam unter sorgfältigem Vermeiden von Luftblasen in die Kammern einlaufen gelassen, nachdem die Objektträger etwas gegeneinander verschoben, und die Einlaufsstelle durch die Flamme gezogen war. Die Kammern wurden sodann mit einem Gemisch von geschmolzenem Paraffin und Vaseline ana gut abgedichtet, um ein Austrocknen zu verhindern, und wurden 24 Stunden bei 37° bebrütet. Danach waren die Kolonien in der dünnen Blutschicht, die bei stets wagerechter Lagerung wie ein fester, unbeweglicher Nährboden wirkt, gut ausgewachsen und mit bloßem Auge oder schwacher Vergrößerung leicht auszuzählen. Zur Kontrolle wurden 10 cmm der gleichen Bakterienverdünnung mit Agar zu Platten ausgegossen. Waren die niedrigen Verdünnungen in den Kontrollplatten nicht auszählbar, so wurden sie durch Multiplikation aus den höheren berechnet. Der Quotient aus der Zahl der auf Agar gewachsenen Kolonien und denen in der Blutkammer ausgezählten ergab den bakteriziden Wert des Blutes. Die Berechnung geschah im einzelnen derart, daß jede Verdünnung doppelt angesetzt wurde, und aus dem Mittelwert der Quotient für jede Verdünnung berechnet wurde. Das Mittel aus den drei Quotienten bildete den bakteriziden Index.

1. Prüfung von Normal-Menschenbluten.

Nach dieser Technik wurden 25 Normal-Menschenblute geprüft. Die Ergebnisse sind in Tabelle I niedergelegt. (Siehe Seite 9).

Es ergaben sich also ziemlich große Unterschiede im bakteriziden Index bei Normal-Menschenbluten; etwa 60% der Normal-Blute haben einen bakteriziden Wert für Staphylococcen, der zwischen 2 und 3 liegt, bei 31% beträgt der Index 3 bis 4 und nur 9% weisen einen Index auf, der höher als 4 ist.

2. Blute von Patienten mit Staphylococcenerkrankungen.

Es standen uns leider nur 5 Patientenblute zur Verfügung. Ihre Annamnese ergibt folgendes: Patient Nr. 1: Furunkulose. Seit 6 Wochen bestand ein Recidiv am Hals, welches zweimal bestrahlt worden war.

Patient Nr. 2: Abszes, der 4 Wochen bestand und am Hals lokalisiert war. Die Erkrankung war zur Zeit der Blutentnahme bereits im Abklingen.

Patient Nr. 3: 2 Wochen alter Furunkel auf der linken Gesichtshälfte, welcher nach erfolgter Incision abzuheilen begann.

Patient Nr. 4: chronische Osteomyelitis, die bereits schwere Knochenveränderungen nach sich gezogen hatte.

Patient Nr. 5: 5 Tage alter Nackenfurunkel.

Die Ergebnisse der Untersuchungen gibt Tabelle II wieder. (Siehe Seite 10).

Die bakteriziden Werte der Patientenblute sind ungefähr die gleichen, wie die der Normalblute. Wir fanden jedenfalls keine abnorm niedrigen, aber auch keine abnorm hohen Werte, abgesehen von Patient Nr. 5, der einen etwas höheren Index aufweist, als der höchste Normalwert betrug.

Allerdings berechtigt die kleine Zahl der Patientenblute nicht zu bindenden Schlüssen. Die Ergebnisse stimmen jedoch mit denen von Pfalz überein, der eine wesentliche Aenderung des bakteriziden Index im Sinne eines Absinkens erst bei schweren septischen Erkrankungen fand. Auch Wolff schließt aus seinen Untersuchungen an Staphylomykosekranken, daß Furunkulose, Vaccination und Genesung keinen Einfluß auf den bakteriziden Wert des Blutes habe.

Tabelle I.

Bakterizidie-Werte von Normalmenschenbluten.

	Kolonienzahl im Blut bei Verdünnung der Bakterien von						Kolonienzahl im Agar			
	1:240		1:480		1:960		1:240, 1:480, 1:960			
Nr.	Orig. Werte	Durchschnitt	Orig. Werte	Durchschnitt	Orig. Werte	Durchschnitt				bakterizider Index
1	nicht zählbar		40/44	42	20/20	20	183	84	39	2
2	131/136	133	68/67	67	29/30	30	200	112	66	2
3	nicht zählbar		59/52	55	30/28	29	224	112	66	2,1
4	200/185	190	128/132	130	48/71	60	536	268	134	2,2
5	92/96	94	48/50	49	24/26	25	200	112	66	2,3
6	nicht zählbar		115 120	118	58/54	56	574	287	140	2,5
7	86/82	84	43,35	39	18/20	19	221	94	46	2,5
8	110/105	107	52/55	53	19/28	23	324	126	51	2,5
9	67/80	73	33/37	35	18/27	22	221	94	46	2,6
10	160 168	164	80/95	87	38/36	37	514	256	90	2,8
11	295/480	387	140/146	143	74/80	77	955	440	222	2,8
12	87/88	83	46/45	45	24/26	25	324	126	51	2,9
13	165/168	166	83,87	85	37/34	35	514	256	90	2,9
14	87/96	91	41/33	37	27/24	25	324	126	51	3
15	84/94	89	42/41	42	22/16	19	252	126	60	3,1
16	57/70	63	30/27	29	18/15	16	198	96	46	3,1
17	76/73	75	32,41	36	13/21	17	200	112	66	3,2
18	72/55	63	24/30	27	7/11	9	183	84	39	3,4
19	nicht zählbar		80 87	83	36/43	40	574	287	140	3,5
20	230 242	236	122/128	125	66/55	60	955	440	222	3,7
21	nicht zählbar		32/36	34	15/14	15	224	112	66	3,9
22	36 28	33	23/30	26	10/12	11	183	84	39	4,1
23	120/125	123	66 73	70	32/31	31	557	287	140	4,4
24	145/136	140	70/75	74	36/23	30	536	268	134	4,5
25	197/185	191	91/110	100	49/50	50	955	440	223	4,6

Tabelle II.

Bakterizidie-Werte von Patientenbluten.

Nr.	Art, Dauer der Erkrankung	Kolonienzahl im Blut bei Verdünnung der Bakterien von 1 : 240		1 : 480		1 : 960		Kolonienzahl im Agar 1 : 240, 1 : 480, 1 : 960			Bakt. Index
		Orig. Werte	Durchschnitt	Orig. Werte	Durchschnitt	Orig. Werte	Durchschnitt				
1	Furunkulose 6 Wochen bestehend	85 94	90	32 60	46	20 24	22	221	94	46	2,1
2	Abszeß 1 Woche bestehend	100 91	95	32 55	44	23 21	22	221	94	46	2,3
3	Furunkel 2 Wochen besteh.	92 96	94	48 50	49	24 26	25	200	112	66	2,3
4	Osteomyel. chron.	54 43	49	27 25	26	9 11	10	183	84	39	3,7
5	Furunkel 5 Tg. bestehend	52 40	46	20 20	20	11 11	11	220	100	46	4,8

3. Blute von normalen Kaninchen und Meerschweinchen.

Zur Prüfung benützten wir die Blute von je 5 normalen Kaninchen und Meerschweinchen. Für Kaninchen- und Meerschweinchenblute mußte die Bakterienaufschwemmung weiter verdünnt werden, da sonst keine isolierten Kolonien in den Kammern auswuchsen. Wir benutzten Verdünnungen von Haften über 1 : 1920, 1 : 3840 und 1 : 7680. Wie Tabelle III zeigt, haben beide Tierarten nur ganz geringe bakterizide Fähigkeiten. (Siehe Seite 12).

Zusammenfassung.

Der bakterizide Index von Normalmenschenbluten schwankt zwischen 2,0 und 4,6. Er liegt im Durchschnitt bei etwa 3. Blute von Patienten mit Staphylomykosen haben ungefähr die gleichen Bakterizidie-Werte. Normale Kaninchen dagegen haben einen Durchschnittsindex von 1,4, normale Meerschweinchen einen solchen von etwa 1,6.

Abschnitt II.

Prüfung des Blutserums auf Staphylococcen-Antitoxingehalt.

An eine Prüfung des Antitoxingehaltes von Blutserum konnte man erst denken, als die Eigenschaften des Staphylococcen-Toxins geklärt waren, und Methoden zu einer sicheren Titration des Toxins gegeben waren. Das Staphylococcentoxin tritt durch 3 verschiedene Wirkungen in Erscheinung:

1. Die von Lingelsheim, ferner Neisser und Wechsberg zuerst beobachtete nekrotisierende Wirkung: Staphylococcentoxin ruft bei intrakutaner Injektion am Kaninchen nach 1 bis 2 Stunden Blaßwerden der Haut, nach 24 Stunden Oedembildung mit nachfolgender Nekrose hervor.

2. Die von Kraus und Pribram festgestellte akut tötende Fähigkeit: 1 bis 2 ccm von Staphylococcentoxin vermögen nach intravenöser Injektion Kaninchen in 5—30 Minuten akut zu töten.

3. Hämolysierende Wirkung auf rote Blutkörperchen, die ebenfalls Kraus zuerst beschrieben hat.

Diese 3 Eigenschaften des Staphylococcentoxins sind Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Ein Teil

Tabelle III.

Bakterizidie-Werte von normalen Kaninchen- und Meerschweinchenbluten.

	Kolonienzahl im Blut bei Verdünnung der Bakterien von						Kolonienzahl im Agar			
	1 : 1920		1 : 3840		1 : 7680		1 : 1920	1 : 3840	1 : 7680	
Kaninchen Nr.	Orig. Werte	Durchschnitt	Orig Werte	Durchschnitt	Orig. Werte	Durchschnitt				Bakt. Index
1	118/117	117	50/63	56	30/30	30	145	85	39	1,3
2	123/113	118	46/54	50	28/26	27	145	85	39	1,4
3	115/101	108	54/48	51	32/25	28	145	85	39	1,4
4	129/90	108	61/58	59	30 22	26	145	85	39	1,4
5	112/105	108	55 52	53	28 25	26	145	85	39	1,5
Meerschw. Nr.	Orig. Werte	Durchschnitt	Orig. Werte	Durchschnitt	Orig. Werte	Durchschnitt				
1	126/116	121	76/82	80	69/28	48	200	100	53	1,3
2	117/123	120	77/71	74	40/36	38	200	100	53	1,4
3	93/110	101	52/48	50	25 26	25	198	96	46	1,8
4	100/93	97	50/48	49	24/26	25	198	96	46	1,8
5	104 97	100	55/47	51	22/28	25	198	96	46	1,9

der Autoren glaubte, daß diese 3 Wirkungen an 3 verschiedene Bestandteile im Toxin geknüpft seien, während neuerdings Burnet, Parish u. a. m. annehmen, daß die 3 verschiedenen Wirkungen auf einen einheitlichen Stoff zurückzuführen sind. Sie stehen auf dem Standpunkt, daß man die Stärke der hämolytischen Wirkung als Maßstab für die Gesamtwirkung des Toxins auch in Bezug auf seine anderen beiden Eigenschaften ansehen dürfe, daß also der hämolytische Titer des Toxins dem Titer des Gesamttoxins entspricht.

Die hämolytischen Fähigkeiten des Staphylococcentoxins, des sogenannten Staphylolysins, sind eingehend durchforscht worden, wobei sich herausgestellt hat, daß auch Organlipoiden, Lezithinen und ungesättigten Fettsäuren und Fettsubstanzen in einfacher bekannter Zusammensetzung Hämolyse auslösende Wirkungen zukommen. Die Hämolyse ist abhängig von der Konzentration des Toxins und von der Temperatur, bei der die Reaktion verläuft. Nach Burnet ist das Staphylolysin ein echtes Toxin, ebenso wie Diphterie- und Tetanus-Toxin. Es ruft die Bildung von Antitoxinen bei Kaninchen nach subcutaner Injektion hervor.

Zwischen Staphylococcentoxin und Antitoxin bestehen bestimmte Beziehungen, die ebenso wie bei den anderen Toxin-Antitoxinbindungen nach dem Gesetz der multiplen Proportionen verlaufen, derart, daß eine Einheit Antitoxin eine Toxineinheit zu binden vermag.

Daraus ergibt sich die Möglichkeit, den Antitoxingehalt im Serum, ausgedrückt in Antitoxineinheiten, durch Titration des Hämolysegehaltes eines Serum-Toxingemisches verhältnismäßig einfach bestimmen zu können.

Versuchsanordnung:

Das Staphylococcentoxin stellten wir uns nach den Angaben von Parish und Clark (Wellcome, Physiological Research Laboratories, Beckenham, Kent) her. Beide Herren überließen uns auch den Stamm „Wood 86“, einen hochvirulenten Staphyloc. pyogenes aureus, mit dem auch Burnet seine Versuche durchgeführt hat. Der von ihnen angegebene Nährboden stellt eine Verbindung der von Julia Parker angegebenen, gepufferten Fleischbrühe und dem Nähragar nach Burnet dar. Der kombinierte Nährboden wurde folgendermaßen hergestellt: 2% Nähragar, p. H. 7,4 wird mit Parkers Fleischbrühe, die 4% Wittepepton enthält, soweit verdünnt, daß die Agarkonzentration 0,8% beträgt.

Mit dem halbflüssigen Nährboden werden 1 Literflaschen zur Hälfte gefüllt, der Staphylococcenstamm hineingeimpft und das Ganze in einer 25% C 0_2-Atmosphäre bei 37° bebrütet. Nach 24 Stunden Bebrütung wird die gleiche Menge Parkers Fleischbrühe nachgefüllt, und die Flaschen weitere 3 Tage in 25% C 0_2-Atmosphäre bei 37° gehalten. Die C 0_2-Atmosphäre soll ebenso wie die Pufferung des Nährbodens ein stärkeres Alkalischwerden des Mediums verhindern, da nach Walbum die Entstehung eines wirksamen Toxins an ein p. H. von 7,4 gebunden ist. Nach im ganzen 4tägiger Bebrütung wurde das Toxin durch Seitzfilter filtriert, zur besseren Haltbarkeit mit Karbolgentianaviolettlösung (0,05 ccm einer 1% Lösung auf 10 ccm Toxin) versetzt, in sterile Röhrchen abgefüllt und im Eisschrank aufbewahrt.

Zur Titration wurde je 1 ccm des mit Na Cl Lösung in fallenden Verdünnungen angesetzten Toxins mit 1 ccm dreimal gewaschenen, mit Na Cl Lösung 1 : 50 verdünnten Kaninchenblutkörperchen gemischt. Als Toxineinheit wird diejenige Toxinverdünnung bezeichnet, bei der ebennoch Hämolyse eintritt. Wenn z. B. bei der Titration bis zu der Verdünnung 1 : 512 Hämolyse auftritt, so enthält das Toxin in 1 ccm 512 Toxineinheiten. Als Antitoxineinheit gilt diejenige Menge Antitoxin, die eine Toxineinheit zu Neutralisieren vermag.

Der Antitoxingehalt im Serum kann demnach einfach bestimmt werden. Das zu prüfende Menschenserum wird nach Inaktivierung bei 56° in Na Cl Lösung fallend verdünnt, und jedes Röhrchen mit der gleichen Toxinmenge — wir wählten das Vierfache der eben noch lösenden Dosis, also 4 Toxineinheiten in 1 ccm — versetzt. Nach $^1/_2$stündigem Aufenthalt bei 37° wurde 1 ccm der gewaschenen Blutkörperchen nachgefüllt, gut durchgeschüttelt, das Gemisch 2 Stunden bei 37° gehalten und darauf das erste Mal der Grad der Hämolyse abgelesen. Die Röhrchen kamen dann über Nacht in den Eisschrank, wo die Hämolyse noch etwas weiter ging. Die endgültige Ablesung erfolgte erst jetzt. Diejenige Serumverdünnung, bei der eben vollständige Hämolyse auftritt, enthält kein Antitoxin mehr; diejenige Serumverdünnung, die eben noch die Hämolyse hemmt, enthält also 4 Antitoxineinheiten. Der Antitoxingehalt in 1 ccm Serum berechnet sich demnach aus der eben noch hemmenden Serumverdünnung multipliziert mit 4.

1. Prüfung von Normal-Menschenserum.

Nach dieser Versuchsanordnung wurden 25 Normalmenschenseren, deren bakterizider Index im Blut im Abschnitt I niedergelegt ist, geprüft. Das Ergebnis enthält Tabelle IV. Ihr sind die Ablesungen nach Aufenthalt im Eisschrank zugrundegelegt. (Siehe Seite 16).

Die Normalmenschensera weisen im Durchschnitt einen Antitoxingehalt von 256 bis 512 Antitoxin-Einheiten auf, nur wenige Blute haben einen etwas höheren Antitoxingehalt und nur ein Blut enthält geringere Antitoxinmengen. Es kommen also geringe Schwankungen im Antitoxingehalt der Normalmenschenblute vor. Die von uns gefundenen Antitoxinwerte liegen etwas höher als die von Bryce und Burnet angegebenen; wir möchten glauben, daß sich diese Differenz durch Unterschiede in der Ablesung erklärt, nicht durch Unterschiede im Antitoxingehalt unserer Sera, wenn gleich wir uns, soweit das bei den kurzen Angaben von Bryce und Burnet möglich war, eng an ihre Technik gehalten haben.

2. Prüfung von Patientensera.

Auch die Patientensera zeigen gleichartige Schwankungen im Antitoxingehalt. Es hat allerdings den Anschein, als ob verhältnismäßig hohe ebenso wie verhältnismäßig niedrige Werte häufiger vorkommen; wir finden jedoch keine absolut höheren und niedrigeren Werte, als sie auch Normalsera aufweisen. Auch hier muß wiederholt werden, daß die Zahl der untersuchten Patientenblute zu gering ist, um irgend welche Schlüsse zu ziehen. (Tabelle V. Siehe Seite 17).

Wenn auch leichtere Staphylococcenerkrankungen im Augenblick der Untersuchung, wie schon Neisser und Wechsberg zeigten, ohne wesentlichen Einfluß auf den Antitoxingehalt des Blutes sein können, so scheinen sie sich, wie wir aus den Versuchen von Bryce und Burnet annehmen dürfen, im Laufe des Lebens doch auf den Antitoxingehalt des Blutes auszuwirken.

3. Prüfung von normalen Kaninchen- und Meerschweinchenseren.

Bei gesunden Meerschweinchen und Kaninchen liegen die Antitoxinwerte des Serums viel niedriger als bei normalen Menschen. (Tabelle VI. Siehe Seite 18).

Tabelle IV.

Staphylococcen-Antitoxingehalt im Serum normaler Menschen.

Nr.	Haemolyse in Serumverdünnung 1: 32	64	128	256	512	Antitoxineinheiten in 1 ccm Serum
1	—	—	—	+	+ +*	512
2	—	—	—	+	+ +	512
3	—	—	—	—	+ +	1024
4	—	—	+	+ +	+ +	256
5	—	—	—	—	+ +	1024
6	—	—	+	+	+ +	256
7	—	—	+	+	+ +	256
8	—	—	+	+	+ +	256
9	—	—	+	+ +	+ +	256
10	—	—	+	+ +	+ +	256
11	—	—	—	+	+ +	512
12	—	—	—	+ +	+ +	512
13	—	—	—	+	+ +	512
14	—	—	+	+ +	+ +	256
15	—	—	—	+	+ +	512
16	—	—	+	+ +	+ +	256
17	—	—	—	+	+ +	512
18	—	—	—	+	+ +	512
19	—	—	+	+ +	+ +	256
20	—	—	—	+	+ +	512
21	—	—	—	+	+ +	512
22	—	—	—	—	+ +	1024
23	—	+	+	+ +	+ +	128
24	—	—	+	+	+ +	256
25	—	—	—	+	+ +	512

* + + = vollständige Haemolyse.
+ = unvollständige Haemolyse.
— = keine Haemolyse.

Tabelle V.

Staphylococcen-Antitoxingehalt im Patientenserum.

Nr.	Erkrankung	Hämolyse in Serumverdünnung 1:						Antitoxineinheiten in 1 ccm Serum
		32	64	128	256	512	1024	
1	Furunkel	—	+	+ +	+ +	+ +	+ +	128
2	Abszeß	—	—	+	+ +	+ +	+ +	256
3	Furunkel	—	—	—	—	+ +	+ +	1024
4	Osteomyelitis	—	—	—	—	+	+ +	1024
5	Furunkel	—	—	—	+ +	+ +	+ +	512

Tabelle VI.

Staphylococcen-Antitoxin im Serum von normalen Kaninchen.

Nr.	Hämolyse in Serumverdünnung 1: 16	32	64	128	256	Antitoxineinheiten in 1 ccm Serum
1	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	weniger als 64
2	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	64
3	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	64
4	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	64
5	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	64

Staphylococcen-Antitoxin im Serum von normalen Meerschweinchen.

1	+ +	+ +	+ +	+ +	+ +	64
2	—	+	+ +	+ +	+ +	64
3	—	+	+ +	+ +	+ +	64
4	—	+	+ +	+ +	+ +	64
5	—	+ +	+ +	+ +	+ +	64

Zusammenfassung.

Im Antitoxingehalt von Normalmenschenseren treten leichte individuelle Schwankungen auf. Die Schwankungen wiederholen sich bei Seren von Patienten, die an Staphylococcenerkrankungen leiden; die hier gefundenen Werte sind jedoch nicht höher oder niedriger als bei Normalseren. Gesunde Meerschweinchen und Kaninchen haben einen niedrigeren Antitoxingehalt im Serum.

Abschnitt III.

Vergleich des bakteriziden Index der geprüften Blute mit dem Antitoxingehalt ihres Serums

Die Ergebnisse sind in Tabelle VII zusammengestellt. (Siehe Seite 20).

Aus Tabelle VII geht hervor, daß unverkennbar ein Zusammenhang zwischen Höhe des bakteriziden Index und Antitoxingehalt im Blut besteht.

So haben die Kaninchenblute mit dem geringsten bakteriziden Index von durchschnittlich 1,4 den niedrigsten Antitoxingehalt, nämlich weniger als 64 Antitoxineinheiten in 1 ccm Serum. Meerschweinchen, deren Blute einen etwas höheren bakteriziden Index besitzen (1,6), zeigen dementsprechend etwas höheren Antitoxingehalt, etwa 64 Antitoxineinheiten. Menschenblute, die stets einen viel höheren bakteriziden Index besitzen, weisen auch immer einen höheren Antitoxingehalt auf. Eine Übereinstimmung vom bakteriziden und antitoxischen Titer im Einzelfalle ist jedoch beim Menschen nicht nachweisbar. Wir fanden Blute mit niedrigem bakteriziden Index und hohem Antitoxingehalt und umgekehrt; bei Berechnung von Durchschnittswerten allerdings läßt sich bei Bluten mit einem bakteriziden Index über 3,0 ein höherer Antitoxingehalt, nämlich 585 Antitoxineinheiten im Durchschnitt, feststellen, gegenüber 409 Antitoxineinheiten bei Bluten mit einem bakteriziden Index unter 3,0.

Die Immunisierung bei Menschen infolge von Staphylococceninfektionen erstreckt sich also nicht gleichmäßig auf die Bildung von bakteriziden und antitoxischen Antikörpern, sondern gelegentlich kann es zum An-

Tabelle VII.

Vergleich des bakteriziden Index mit dem Antitoxingehalt aller geprüften Blute.

	Normalmenschenblute		Patientenblute	
Nr.	Bakt. Index	Antitoxineinh.	Bakt. Index	Antitoxineinheiten
1	2	512	2,1	128
2	2	512	2,3	256
3	2,1	1024	2,3	1024
4	2,2	256	3,7	1024
5	2,3	1024	4,8	512
6	2,5	256	Kaninchenblute	
7	2,5	256	1,3	> 64
8	2,5	256	1,4	> 64
9	2,6	256	1,4	> 64
10	2,8	256	1,4	> 64
11	2,8	512	1,5	> 64
12	2,9	512	Meerschweinchenblute	
13	2,9	512	1,3	64
14	3	256	1,4	64
15	3,1	512	1,8	64
16	3,1	256	1,8	64
17	3,2	512	1,9	64
18	3,4	512		
19	3,5	256		
20	3,7	512		
21	3,9	512		
22	4,1	1024		
23	4,4	128		
24	4,5	256		
25	4,6	512		

steigen eines der beiden Antikörperanteile kommen. (Siehe Fall Nr. 3, 5 und 23 in Tabelle VII).

Bei den Patientenbluten haben wir ungefähr die gleichen Verhältnisse. Zweimal hoher bakterizider Index und hoher Antitoxingehalt, zweimal beide Antikörperanteile niedrig und bei Fall 3 hoher Antitoxingehalt bei niedrigem bakteriziden Index.

Um die Zusammenhänge zwischen bakteriziden und antitoxischen Antikörpern zu studieren, bestimmten wir den bakteriziden Index und den antitoxischen Titer nach Absättigung des betreffenden Serums mit abgetöteten Staphylococcen. Die Versuchstechnik gestaltete sich im einzelnen folgendermaßen: 1 ccm defibriniertes Menschenblut wird zentrifugiert, das Serum abpipettiert, mit 3 Ösen eine Stunde bei 100° abgetöteten Staphylococcen (Stamm Wright) versetzt und 2 Stunden im Brutschranke gehalten. Dann werden die Bakterien abzentrifugiert und das so abgesättigte Serum in gleichem Mengenverhältnis wieder den Blutkörperchen zugesetzt. Vom Waschen der Blutkörperchen sahen wir ab, da nach Versuchen von Leonhardi (Dissertation 1934, Breslau) mit Streptococcen dabei eine erhebliche Schädigung des Blutes und ein Absinken des bakteriziden Index eintrat. Ebenso ist nach Leonhardi eine Absättigung des ganzen Blutes nicht möglich, da sich die abgetöteten Bakterien nicht aus dem Blut entfernen lassen und die Ergebnisse verschleiern. Wir prüften dann den Bakterizidiegehalt des Blutes vor und nach Absättigung des Serums und ebenso den Antitoxingehalt. (Ergebnisse siehe Tabelle VIII, Seite 22).

Durch Absättigung des Serums mit abgetöteten Staphylococcen gelang es also, die bakteriziden Eigenschaften des Blutes zum Teil zu entfernen. Der Grad des Absinkens des bakteriziden Index hängt von dem Normalindex des Blutes ab, derart, daß bei niedrigem Normalindex nach Absättigung der Index niedriger wird, als bei hohem Normalindex. Eine unspezifische Wirkung der abgetöteten Staphylococcen konnten wir durch Absättigungsversuche mit Kaolin ausschliessen. Nach Absättigung mit Kaolin blieb der bakterizide Index so gut wie unverändert (Tabelle VIII). Der Antitoxingehalt des Serums dagegen wurde durch die Absättigung mit abgetöteten Staphylococcen nicht verändert. Die Ab-

Tabelle VIII.

Prüfung von Blut und Serum nach Absättigung des Serums.

Nr.	Bakterizider Index im Blut			Antitoxineinheiten in 1 ccm Serum		
	Normal	Abgesättigt mit Staphyloc.	Abgesättigt mit Kaolin	Normal	Abgesättigt mit Staphyloc.	Abgesättigt mit Kaolin
1	3	1,6		256	256	
2	1,8	1,2		128	128	
3	2,9	2,2		256	256	
4	2,8	2,3		256	128	
5	6,4	4,8		1024	1024	
6	2	1,4		256	256	
7	2,5	1,7	2,3	1024	1024	1024
8	3,3	1,9	3,2	512	512	512

sättigungsversuche zeigen also ebenfalls, daß im Menschenblut keine Zusammenhänge zwischen bakteriziden und antitoxischen Antikörpern bestehen. Sie zeigen aber auch, daß der Gehalt des Serums an bakteriziden Antikörpern bei der von uns angewandten Versuchsanordnung nicht so gering ist, wie vielfach angenommen wird. (Mackie und Finkelstein, Zeißler . . .)

Zusammenfassung.

1.) Der bakterizide Index bei normalen Kaninchen- und Meerschweinchenbluten ist sehr niedrig, 1,4 bis 1,6, dementsprechend ist der Antitoxingehalt der Seren gering, bis zu 64 Antitoxineinheiten in 1 ccm Serum.

2.) Bei Bluten normaler Menschen und solchen, die an Staphylococcenerkrankungen leiden, schwankt der bakterizide Index individuell beträchtlich; er liegt wesentlich höher als bei den geprüften Tierbluten (2,0 bis 4,8).

3.) Entsprechend zeigen zwar die Sera der geprüften Menschenblute auch einen höheren Antitoxingehalt (256 bis 1024 Einheiten in 1 ccm), aber im Einzelfalle braucht kein Zusammenhang zwischen beiden Antikörperarten zu bestehen. Es kommen Blute vor mit hohem bakteriziden Index und geringem Antitoxingehalt und umgekehrt, daneben Blute, bei denen antitoxische sowie bakterizide Werte hoch, bezw. niedrig liegen.

4.) Versuche mit abgesättigten Seren (für Bakterizidie-Versuche wurde das Serum abzentrifugiert, abgesättigt und den Blutkörperchen wieder zugesetzt) ergaben eine Herabsetzung des bakteriziden Index im abgesättigten Blut, aber keine Verminderung des antitoxischen Titers im abgesättigten Serum. Es besteht also kein direkter Zusammenhang zwischen bakteriziden und antitoxischen Körpern gegen Staphylococcen.

Anschließend ist es mir eine angenehme Pflicht, Fräulein Privatdozent Dr. G. Meißner meinen aufrichtigen Dank für die Anregung zu diesen Versuchen und die mannigfache Unterstützung bei deren Ausführung sowie bei Abfassung dieser Arbeit auszusprechen.

Literatur.

1. **Buchner,** Arch. f. Hyg. B. 10, 1890. p. 84. B. 17. 1893. p. 112. ders. Zentrbl. f. Bakt. u. Parask, 1889. B. 5 p. 817 B. 6 p. 1.
2. **Burnet,** The Journ. of Path. a. Bakt. 1929. Bd. 32, p. 717. 1930, Bd. 33 I, p. 1. 1931, Bd. 34, p. 471.
3. **Bryce u. Burnet,** Journ. of Path. 1932. Bd. 35, p. 183.
4. **Braun,** Kli. Wo. 1922. p. 2538.
5. **Colebrook,** Journ. of exp. Pathol. 1924. p. 47.
6. **Dold,** Ztbl. Bakt. Orig. 102. 1927. S. 1.
7. **van Durme,** Hyg. Rsch. 1903. B. 13, p. 66.
8. **Geller,** Med. Kl. 1928 p. 85. ders. Arch. f. Gyn. 1928, Bd. 134, p. 141.
9. **Grohs,** Kli. Wo. 1927 p. 1079. ders. Ztbl. Bakt. Orig. 107, 1928 p. 415, Bd. 115, 1930. p. 367.
10. **Gruber,** zitiert nach Knorr in Kolle-Kraus-Uhlenhut Bd. II 2.
11. **Guttmann,** Monatschr. f. Geb. u. Gyn. 1929.
12. **Julianelle,** Journ. of inf. dis. 1922, Bd. 31 p. 256.
13. **Kossel,** Zeitschr. f. Hyg. 1898 Bd. 27 p. 36.
14. **Kraus u. Clairmont,** Wi. Kl. Wo. 1901, 1902.
15. **Kraus u. Pribram,** Wi. Kl. Wo. 1906.
16. **Leonhardi,** Dissertation 1934. Breslau.
17. **von Lingelsheim,** zitiert n. Ko. Kr. Uhl. IV. 1 S. 451.
18. **Mackie, T. J. u. Finkelstein, M. H.** Journ. of Hyg. 1932, Vol. 32 p. 1.
19. **Madsen,** Ztbl. f. Hyg. 1899 Bd. 32 S. 214. Orig. 1906. Bd. 40 p. 409.
20. **Meißner, G,** Ztbl. f. Bakt. Abt. I. Orig. 1928 Bd. 106 p. 210.
21. **Metschnikoff,** Kolle-Wassermann 1913. Bd. 2 p. 655.
22. **Much,** Tb. Hamb. Staatskrankh. 1907, Bd. 12 S. 169, ebenda 1912 Bd. 16 S. 88.
23. **Neisser,** Handb. d. path. Mikroorg. Ko. Kr. Uhl. 4.
24. **Neisser M,** Wi. Kl. Wo. 1900 Nr. 48, 49.
25. **Neisser u. Wechsberg,** Zsch. f. Hyg. 1901, Bd. 36 S. 299. D. med. Wo. 1900 p. 790.

26. **Neufeld u. Meyer,** Zschr. f. Hyg. 1924 Bd. 103 S. 595.

27. **Nuttal,** Zschr. f. Hyg. 1888 Bd. 4 S. 353.

28. **Parker,** Journ. of exp. Med. Bd. 40 1924 S. 761.

29. **Pfeiffer R,** Zschr. f. Hyg. 1894 Bd. 16 p. 267.

30. **Parish u. Clark,** The Journ. of Path. and Bakt. Vol. 35 1932 S. 251.

31. **Pfalz,** Arch. f. Gyn. 1928, Bd. 134 p. 73. ders. Kl. Wo. 1930 p. 1343 u. 1931 p. 306. D. Med. Wo. 1928 S. 1121 u. 1248.

32. **Prausnitz C. u. Meißner G.,** Zbl. f. Bakt. 1925 Abt. I. Orig. Bd. 94 p. 376, ebenda 1926 Bd. 97 Beiheft p. 171.

33. **Scholz H. G.,** Kl. Wo. 1931 p. 1069.

34. **Walbum,** Zschr. f. Im. F. 1909 Bd. III p. 70.

35. **Wolff,** Zschr. f. Imm. For. 1926 Bd. 45 p. 515. ders. 1927 Bd. 50 p. 543.

36. **Wright,** The Lancet 1912 v. 14. u. 21. Dez. ders. Ann. d. l'Inst. Pasteur 1923 Bd. 37 S. 107.

37. **Zeißler,** Jb. Hamb. Staatskr. 1911 Bd. 16 S. 77.

Lebenslauf.

Ich bin am 26. Februar 1908 in Cosel OS. als Sohn des Justizinspektors Paul Frenzel und seiner Ehefrau Helene geb. Lipka geboren. Ich besuchte das Gymnasium zu Beuthen OS. bis zur Reifeprüfung Ostern 1929. Anschließend studierte ich Zahnheilkunde in Breslau bis zum Wintersemester 1932/33 einschl. Mein Physikum bestand ich im August 1930, mein Staatsexamen im Februar 1933, beide in Breslau. Seit 1. Mai 1933 bin ich in Peiskretscham OS. als Zahnarzt tätig.

Lothar Frenzel.